

Die Wirkung von Thio-TEPA auf HeLa-Zellen

Richard Philipp

1975

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Direktor: Professor Dr. Otto Hug

Die Wirkung von Thio-TEPA auf HeLa-Zellen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig - Maximilian - Universität
zu München

vorgelegt von

Richard P H I L I P P
aus München

München 1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. O. Hug

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1975



Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Otto Hug für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchzuführen und für seine wertvollen Anregungen, die zum Gelingen meiner Dissertation wesentlich beitrugen.

Weiterhin danke ich Herrn Priv.Do. Dr. K.R. Trott für seine Hilfe und Erfahrung, die er mir jederzeit zur Verfügung stellte, sowie allen Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Institutes, die meine Versuche freundlicherweise unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Einführung	1
Material und Methoden	
1. Cytostatikum	2
2. Zellkultivierung	3
3. Durchführung der Versuche	4
a. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Thio-TEPA-Konzentration	4
Tabelle 1: Zusammensetzung und Herstellung des verwendeten Nähr- mediums	5
b. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Einwirkdauer des Thio-TEPA	6
c. Abhängigkeit der Überlebensrate bei fraktionierter Gabe von Thio-TEPA	6
Ergebnisse	
1. Konzentrationseffekt-Beziehung	7
2. Effekt der Expositionszeit	8
3. Fraktionierungsversuch	10
4. Die Wirkung von Thio-TEPA auf dicht gewachsene HeLa-Zellkulturen	11
Diskussion	
1. Dosiseffekt-Beziehung	14
2. Die Rolle der Einwirkdauer	16
3. Fraktionierungsversuch	18
Tabellen	
1. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Konzentration (Tab. 2 - 7)	22
2. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Einwirkdauer (Tab. 8 - 10)	25

3. Abhängigkeit der Überlebensrate vom Fraktionierungsintervall (Tab. 11 - 13)	27
4. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Konzentration (Zweiter Versuchs- ansatz, Tab. 14 u. 15)	29
5. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Einwirkdauer (Zweiter Versuchs- ansatz, Tab. 16 u. 17)	30
6. Abhängigkeit der Überlebensrate vom Fraktionierungsintervall (Zweiter Versuchsansatz, (Tab. 18 - 20)	31
Zusammenfassung	33
Literaturverzeichnis	34

Die Wirkung von Thio-TEPA auf HeLa-Zellen

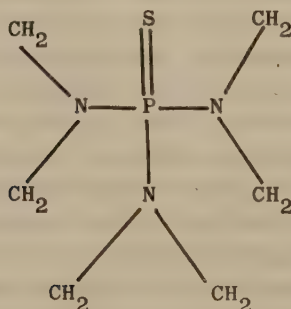
Bei der Therapie maligner Erkrankungen wurden Cytostatika vor allem zur begleitenden Behandlung von chirurgischen und radiologischen Maßnahmen oder im fortgeschrittenen Stadium eingesetzt. Unter den verschiedenen Cytostatika spielt die Gruppe mit alkylierender Wirkung eine bedeutende Rolle in der modernen Chemotherapie. Sie werden entweder in mehrmaligen hohen Dosen mit wochenlangen behandlungsfreien Intervallen oder täglich in wesentlich niedrigerer Dosierung gegeben. Über die unterschiedliche Wirksamkeit dieser beiden Applikationsformen sind bisher kaum grundlegende experimentelle Untersuchungen durchgeführt worden, und man richtete sich weitgehend nach dem klinischen Eindruck. Es besteht dabei eine gewisse Analogie zu der Wirkung ionisierender Strahlen. Die fraktionierte Anwendung von ionisierenden Strahlen führte zu einer wesentlichen Verbesserung in der Behandlung maligner Tumoren, bedarf jedoch noch immer der experimentellen Unterbauung. Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit neben der Wirkungsabhängigkeit von der Konzentration und der Einwirkdauer auch untersucht werden, ob bei Cytostatika ebenfalls ein Fraktionierungseffekt auftritt. Für diese Experimente wurde das alkylierende Thio-TEPA ausgewählt, das in der Klinik vor allem lokal angewendet wird.

Material und Methoden

1. Cytostatikum

Thio-TEPA ist ein Cytostatikum aus der Gruppe der alkylierenden Zellkerngifte, das neben parenteraler Verwendung auch sehr gut lokal anwendbar ist, da es im Gegensatz zu anderen alkylierenden Substanzen nicht erst in der Leber in seine aktive Form umgewandelt werden muß.

Chemische Formel von Thio-TEPA: (N,N',N'',- Triäthylenphosphoramid)



Es wird zu den multifunktionellen alkylierenden Substanzen gerechnet, da es mehrere Äthylenimin-Gruppen besitzt, die als Äthyleniminradikale rasch mit den Amino- und Sulfid-Gruppen im Organismus reagieren.

Verwendet wurden die handelsüblichen Trockenampullen, die 15 mg aktive Substanz und 80 mg NaCl enthalten. Vor Gebrauch wurde der Inhalt der Ampulle in Aqua bidest. gelöst.

2. Zellkultivierung

Die HeLa-Zellen, mit denen die Versuche durchgeführt wurden, teilen sich alle 24 Stunden und wurden einmal pro Woche in neues Medium übergeführt. Die Nährlösung bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium + Hank's Salze (Tab. 1). Bei der Passage der Zellen in frisches Medium wurde die alte Nährlösung abgesaugt, anschließend wurden 5 ml einer K^+ -freien Salzlösung für 10 min. in die Versuchsfaschen gegeben. Dadurch lockert sich der am Flaschenboden festgewachsene Zellrasen. Nach dem Abgießen der K^+ -freien Salzlösung kamen 10 ml einer konzentrierten Trypsinlösung für 10 min. auf die Zellkulturen, wodurch sich die einzelnen Zellen vom Flaschenboden ablösten und frei in der Lösung schwammen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Nährlösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Wenn man zu dieser Lösung noch 10% Kalb-Serum zusetzte, ergab sich bei der Auswertung eine doppelt so hohe Kolonieausbeute (PE) wie ohne Serumzusatz. Die Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe einer Zählkammer (nach BÜRKER) bestimmt, und durch Verdünnungsreihen auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Für die einfache Passage zu Erhaltung der Zellkultur wurden ca 50 000 - 100 000 Zellen in eine Vierkantflasche aus Glas (Schott) zusammen mit 10 ml Nährmedium und 10% Kalb-Serum eingefüllt. Die Flaschenöffnung wurde mit Stanniolfolie verschlossen. Hierauf kamen die Zellen für eine Woche in den Brutschrank zur Inkubation bei 37°C in einer 5% Kohlendioxid-Luft Umgebung. Um die Proliferationsfähigkeit einzelner Zellen zu testen, wurden pro Flasche nur 100 - 1000 Zellen eingesät. Nach 14 tägiger Inkubation war aus jeweils einer proliferationsfähigen Zelle eine Kolonie von mehreren

hundert Zellen entstanden, die nach Färbung mit einer Methylenblau-Lösung mit bloßem Auge sichtbar war. Das Verhältnis der Koloniezahl zur Einsaat (plating efficiency) ergibt die Überlebensrate, die in Prozent angegeben wird.

3. Durchführung der Versuche

Bei der Beurteilung der Wirkung von Thio-TEPA ergaben sich drei Schwerpunkte der Fragestellung: Die Abhängigkeit der Wirkung von Thio-TEPA auf HeLa-Zellen von

- a. der Konzentration
- b. der Einwirkdauer
- c. der Fraktionierung

3a. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Thio-TEPA Konzentration

200 - 1200 Zellen wurden 48 Stunden lang bei 37°C inkubiert, um sicherzugehen, daß die Zellen am Flaschenboden festgewachsen waren.

Es wurde die Wirkung verschiedener Thio-TEPA Konzentrationen auf HeLa-Zellen bei einer konstanten Expositionszeit von 30 Minuten untersucht. Nach dem Abgießen der Nährlösung folgte eine zweimalige Spülung mit Eagle's Medium zur Beseitigung störender Eiweißreste. Dann wurde die in Aqua bidest. gelöste Trockenampulle Thio-TEPA in Nährmedium ohne Kalb-Serum auf die gewünschte Konzentration verdünnt und auf die Zellkultur gegeben. Am Ende der 30 Minuten dauernden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen nach dem Abgießen des Thio-TEPA zweimal mit Eagle's Medium gespült, um das Cytostatikum restlos zu entfernen. Hierauf kam das ursprüngliche Nährmedium

Tabelle 1

Zusammensetzung und Herstellung des verwendeten Nährmedium

Die Nährlösung bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium + Hank's Salze in Pulverform.

Eine Ampulle zu 10,7g enthielt:

Zusammensetzung	mg/l	Zusammensetzung	mg/l
NaCl	8000	KCl	400
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60	L-Methionin	15
KH_2PO_4	60	L-Phenylalanin	32
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200	L-Threonin	48
CaCl_2 wasserfrei	140	L-Tryptophan	10
Glucose	1000	L-Tyrosin	36
Phenolrot	10	L-Valin	46
L-Arginin	105	Cholinchlorid	1
L-Cystin	24	Folsäure	1
L-Glutamin	292	i-Inosit	2
L-Histidin	31	Nicotinamid	1
L-Isoleucin	52,5	D-Pantothensäure-	1
L-Leucin	52,4	Ca-salz	
L-Lysin	58	Pyridoxal HCl	1
Thiamin HCl	1	Riboflavin	0,1

Der Inhalt einer Ampulle wurde mit 350 mg NaHCO_3 , 2 ml 1n NaOH und 100 mg Neomycinsulfat in einem Liter Aqua dest. gelöst und mittels einer Passage durch ein Bakterienfilter sterilisiert.

das 10% Kalb-Serum enthielt, wieder in die Versuchsfaschen zurück.

3b. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Einwirkdauer des Thio-TEPA

Die Behandlung der Zellen bei der Untersuchung der Einwirkdauer entsprach der in 3a beschriebenen.

3c. Abhängigkeit der Überlebensrate bei fraktionierter Gabe von Thio-TEPA

Im Fraktionierungsversuch wurde nach dem Thio-TEPA-freien Intervall die Nährlösung wieder abgegossen und die Zellen mit frischem Eagle's Medium gespült. Nun wurde neues Nährmedium ohne Kalb-Serum, das frisches Thio-TEPA enthielt, auf die Zellkultur gegeben. Nach 30 Minuten Exposition bei 37°C wurde nach dem Abgießen des Thio-TEPA und wiederholtem Spülen das ursprüngliche Nährmedium den Versuchsfaschen wieder zugegeben.

Die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen Inkubation bei 37°C. Die Zahl der gebildeten Kolonien wurde unter der Lupe bestimmt, wobei nur diejenigen berücksichtigt wurden, die aus mindestens 50 Zellen bestanden. Die Kolonieausbeute der unbehandelten Kulturen wurde als 100% festgesetzt und diente als Vergleich für die Versuchsergebnisse.

Ergebnisse (Tab. 2 - 20)

1. Konzentrationseffekt-Beziehung

Aus den Werten der Spalte 6 der Tabellen 2 - 7 wurde eine Dosiseffektkurve in halblogarithmischer Darstellung gezeichnet (Abb. 1). Diese läßt in ihrem Anfangsteil eine ausgeprägte "Schulter" erkennen, in deren Bereich die Wirksamkeit des Thio-TEPA langsam zunimmt. Ab einer Konzentration von 40 μg Thio-TEPA/ml sinkt die Überlebensquote der Zellen stärker ab, um schließlich in einen anscheinend exponentiellen Verlauf überzugehen. Bei einer Dosis von 80 μg wurde auch bei einer Einsaat von 3000 Zellen keine Kolonie gefunden; die Überlebensrate lag also unter 0,001. Die Kurve läßt sich entsprechend dem in der Strahlenbiologie üblichen Formalismus (HUG, 1974) durch eine D_0 von 8 μg und eine D_q von 30 μg beschreiben. Als D_0 wird diejenige Dosis bezeichnet, die im geradlinigen, also exponentiellen Teil der Kurve die Zahl der jeweils noch überlebenden Zellen auf $1/e$ (ca 37%) vermindert. Die D_q ergibt sich bei einer halblogarithmischen Darstellung aus dem Schnittpunkt der Verlängerung des geradlinigen Teils der Kurve mit der Überlebensrate 1 (Quasi-Schwellendosis).

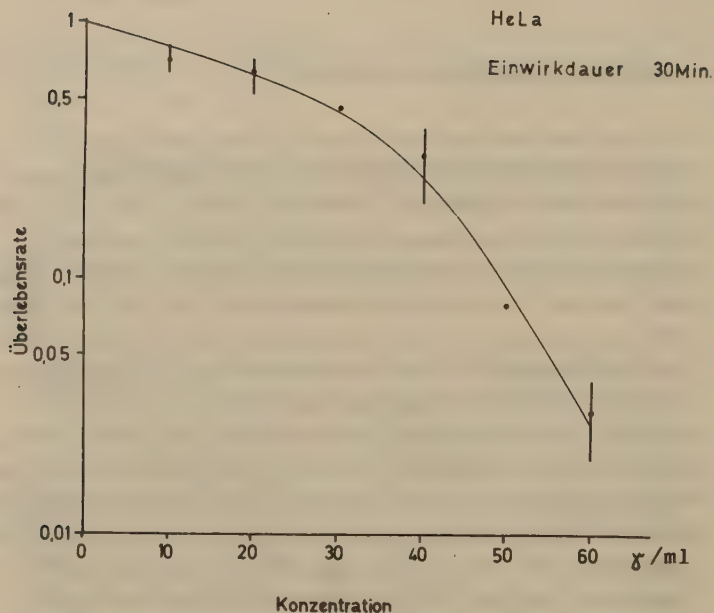


Abb. 1. Überlebensrate von koloniebildungsfähigen HeLa-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Thio-TEPA-Konzentrationen

2. Effekt der Expositionszeit (Tab. 2, 8, 9, 10)

Die Einwirkdauer von $10 \mu\text{g}$ Thio-TEPA/ml wurde über eine Zeitspanne von ein bis vier Stunden untersucht. Von einer längeren Verweildauer wurde abgesehen, da sie für die Anwendung in vivo keine Bedeutung hat. Die Überlebensquote sank in dem Zeitintervall zwischen 30 Minuten und vier Stunden im Durch-

schnitt von 71% auf 28% ab. Aus den Werten der Spalte 5 wurde eine Wirkungskurve in Abhängigkeit von der Expositionszeit gezeichnet (Abb. 2).

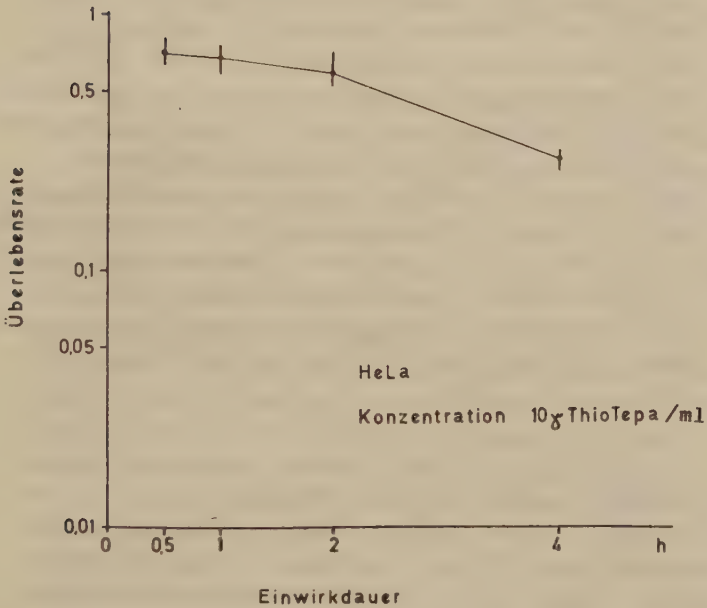


Abb. 2. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkdauer bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g Thio-TEPA}$

3. Fraktionierungsversuch (Tab. 8, 11, 12, 13)

Es galt zu untersuchen, ob die Fraktionierung der Thio-TEPA-Exposition mit einem Intervall, in dem die Zellen dem Cytostatikum nicht ausgesetzt waren, zu einem Anstieg der Überlebensrate führt, wie dies im Falle einer Fraktionierung mit locker ionisierenden Strahlen festgestellt worden ist. Die Pausen zwischen den beiden 30 Minuten dauernden Thio-TEPA-Expositionen betrugen eine bis vier Stunden. Die Überlebensraten (Abb. 3) aller vier Versuche unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Eine Erholung der Zellen konnte somit nicht festgestellt werden; vielmehr lag die Zahl der Überlebenden stets unter dem Wert der nicht fraktionierten Behandlung mit gleicher Gesamtexpositionszeit. Für die Überlebensrate bei nicht fraktionierter Behandlung wurden die Werte aus Tabelle 2 herangezogen.

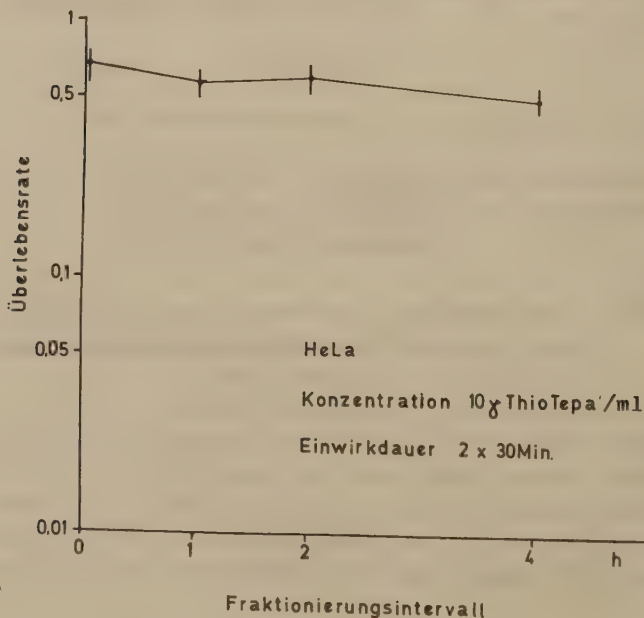


Abb. 3. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängig-

keit von der Dauer des Fraktionierungsintervalls bei einer Konzentration von 10/ μ g Thio-TEPA

4. Die Wirkung von Thio-TEPA auf dicht gewachsene HeLa-Zellkulturen (Tab. 14 - 20)

Bei diesem Versuchsansatz wurden 50 000 - 100 000 Zellen in einer Vierkantglasflasche eine Woche lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde Thio-TEPA in unterschiedlicher Konzentration, Dauer und Fraktionierung angewendet. Nach dem Entfernen des Thio-TEPA wurden die Zellen sofort mit Trypsin suspendiert und mehrere hundert Zellen in neue Flaschen implantiert. Die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen Inkubation. Bei diesem Versuchsansatz, in dem Thio-TEPA auf dicht gewachsene Zellkulturen gegeben und anschließend die Verdünnung und Aussaat in neue Flaschen durchgeführt wurde, wurde die Wirkung von 80/ μ g und 160/ μ g pro ml Thio-TEPA untersucht. Aus den Werten der Spalte 6 der Tabellen 14 und 15 wurde eine Dosiseffektkurve gezeichnet (Abb. 4). Der verwendete Konzentrationsbereich war nicht groß genug, um eine sichere Aussage über die Form der Dosiseffektkurve machen zu können.

Die Wirkung von 80/ μ g Thio-TEPA/ml bei 37°C wurde von 30 Minuten bis vier Stunden untersucht. (Tab. 14, 16, 17). In mehreren Versuchsreihen überlebte nach vier Stunden keine Zelle (Abb. 5). Die Überlebensrate war also kleiner als 0,001. Die Überlebenskurve verläuft sehr steil.

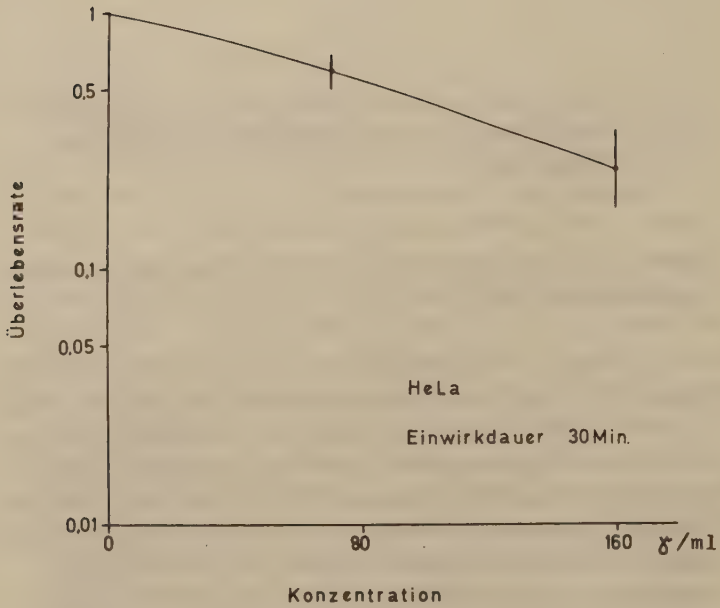


Abb. 4. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Thio-TEPA-Konzentrationen

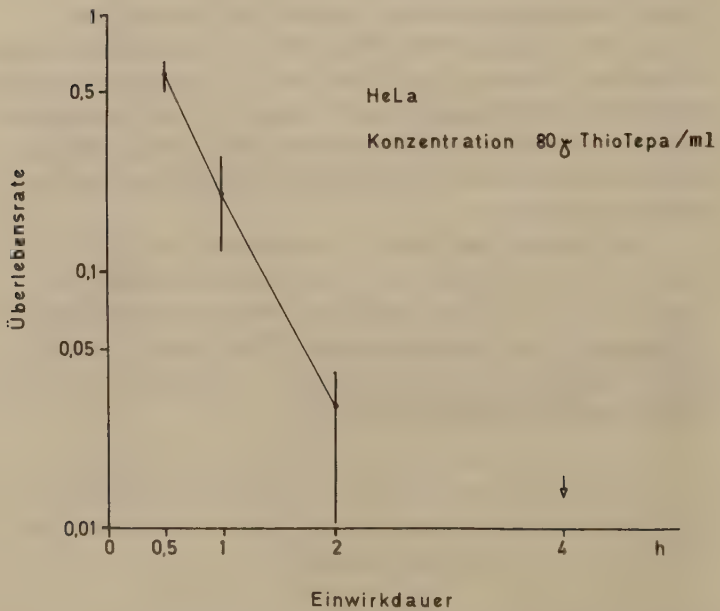


Abb. 5. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängig-

keit von der Dauer des Fraktionierungsintervalls bei einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{g}$ Thio-TEPA

4. Die Wirkung von Thio-TEPA auf dicht gewachsene HeLa-Zellkulturen (Tab. 14 - 20)

Bei diesem Versuchsansatz wurden 50 000 - 100 000 Zellen in einer Vierkantglasflasche eine Woche lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde Thio-TEPA in unterschiedlicher Konzentration, Dauer und Fraktionierung angewendet. Nach dem Entfernen des Thio-TEPA wurden die Zellen sofort mit Trypsin suspendiert und mehrere hundert Zellen in neue Flaschen implantiert. Die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen Inkubation. Bei diesem Versuchsansatz, in dem Thio-TEPA auf dicht gewachsene Zellkulturen gegeben und anschließend die Verdünnung und Aussaat in neue Flaschen durchgeführt wurde, wurde die Wirkung von $80\text{ }\mu\text{g}$ und $160\text{ }\mu\text{g}$ pro ml Thio-TEPA untersucht. Aus den Werten der Spalte 6 der Tabellen 14 und 15 wurde eine Dosiseffektkurve gezeichnet (Abb. 4). Der verwendete Konzentrationsbereich war nicht groß genug, um eine sichere Aussage über die Form der Dosiseffektkurve machen zu können.

Die Wirkung von $80\text{ }\mu\text{g}$ Thio-TEPA/ml bei 37°C wurde von 30 Minuten bis vier Stunden untersucht. (Tab. 14, 16, 17). In mehreren Versuchsreihen überlebte nach vier Stunden keine Zelle (Abb. 5). Die Überlebensrate war also kleiner als 0,001. Die Überlebenskurve verläuft sehr steil.

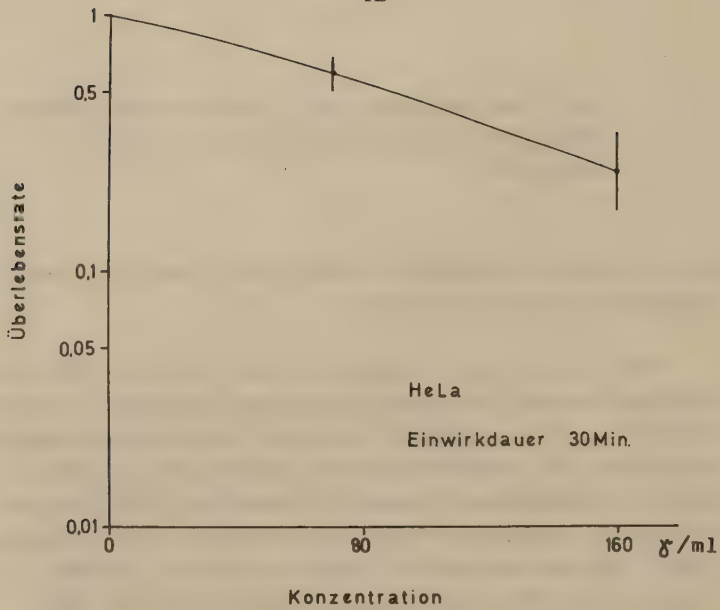


Abb. 4. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Thio-TEPA-Konzentrationen

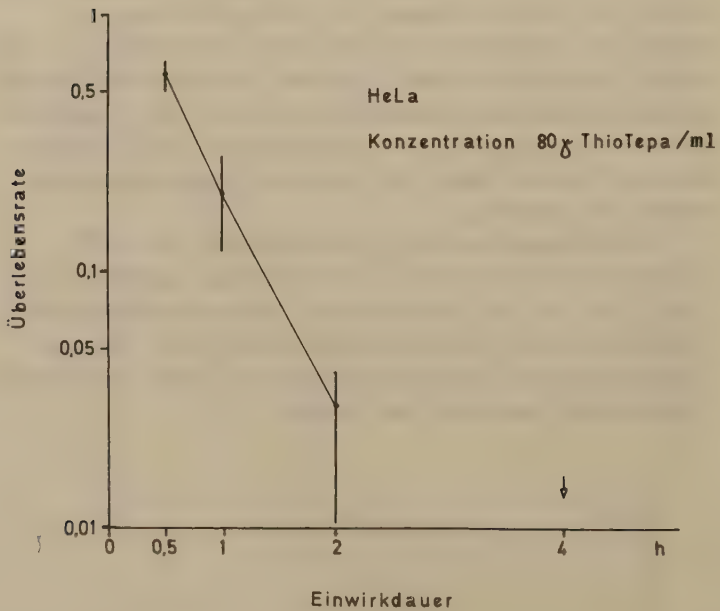


Abb. 5. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängig-

keit von der Einwirkdauer bei einer Konzentration von $80\text{ }\mu\text{g}$ Thio-TEPA

Im Fraktionierungsversuch dauerten die Pausen zwischen den beiden 30 minütigen Thio-TEPA-Expositionen ein bis vier Stunden. Bei allen Versuchen betrug die Konzentration $80\text{ }\mu\text{g/ml}$. Als Vergleich diente die äquivalente, nicht fraktionierte Dosis von einer Stunde. Die Überlebensraten aller Versuchsreihen unterschieden sich nur geringfügig voneinander (Abb.6), (Tab. 18, 19, 20). Eine Erholung der Zellen konnte nicht festgestellt werden; die Zahl der Überlebenden lag stets unter dem Wert der nicht fraktionierten Behandlung.

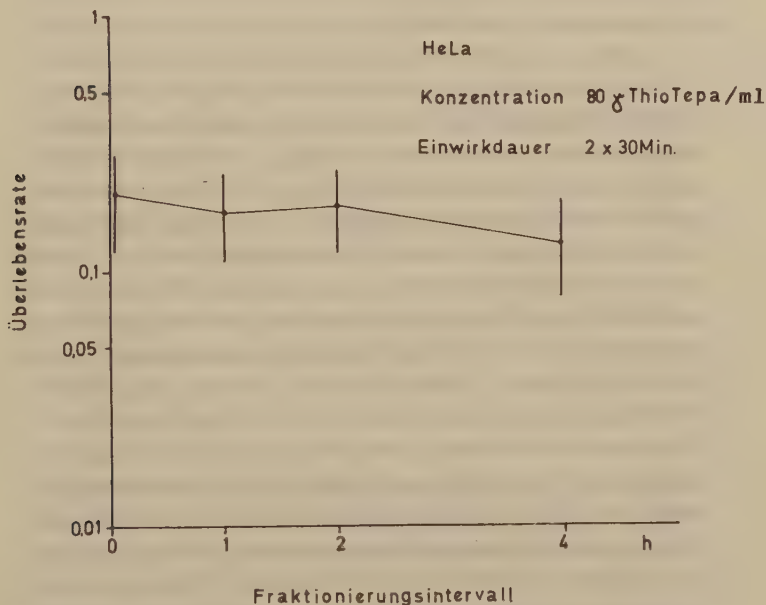


Abb. 6. Überlebenskurve von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Dauer des Fraktionierungsintervalles bei einer Konzentration von $80\text{ }\mu\text{g}$ Thio-TEPA

Diskussion

Für die Beurteilung von Chemotherapeutika und Strahlen ist es von entscheidender Bedeutung ein Kriterium zu finden, das es ermöglicht die Wirkung des zu untersuchenden Agens auf die reproduktive Integrität der Einzelzelle quantitativ zu erfassen. Die Wirksamkeit beider Therapieformen kann in vitro am Prozentsatz der eingesäten Population, der noch zur Koloniebildung fähig ist, gemessen werden. Die Zahl der eingesäten Zellen im Verhältnis zur Zahl der gebildeten Kolonien ergibt die Kolonieausbeute (P.E.)

Dosiseffekt-Beziehung

Alkylierende Cytostatika wirken auf Säugetierzellen inaktivierend und ergeben ähnliche Dosis-effektkurven wie Röntgenstrahlen. Wenn man die Überlebensrate gegen die benutzten Konzentrationen im halblogarithmischen Maßstab aufträgt, so zeigt sich im Anfangsteil der Überlebenskurve bei niedrigen Konzentrationen des einwirkenden Mittels häufig eine "Schulter", die bei zunehmender Konzentration steiler wird und schließlich in eine exponentielle Kurve übergeht. Dieser Verlauf gleicht dem für Röntgenstrahlen gefundenen Kurven (Übersicht bei ELKIND u. WHITMORE, 1967; TROTT, 1972). Thio-TEPA zeigte bei Anwendung auf HeLa-Zellen im Dauerversuch nur eine angedeutete Schulter mit einer ausgeprägten Schwellenfunktion (BERRY, 1966), während andere alkylierende Cytostatika wie Stickstofflost und Epodyl (BERRY, 1966) eine exponentiell verlaufende Dosiseffektkurve ohne Schulter aufwiesen. Auch

andere Versuche mit Stickstofflost (WALKER u. THATCHER, 1968) führten ebenfalls zu einer reinen Exponentialfunktion. Das gleiche gilt für einige Cytostatika anderer Gruppen (BERRY, 1966), wobei sich jedoch große Unterschiede des Kurvenverlaufs bei einer 24 Stunden dauernden Exposition und einer Dauerbehandlung ergaben.

Die Dosiseffektkurve der ersten Versuchsanordnung (Abb. 1), in der frisch eingesäte Zellen behandelt wurden, läßt in ihrem Anfangsteil eine sehr deutliche "Schulter" erkennen; ab einer Konzentration von mehr als 40 μ g Thio-TEPA pro ml sinkt die Kurve steil ab und scheint sich einer Exponentialfunktion anzuschmiegen. Bei 80 μ g/ml fand sich in allen Versuchsreihen keine lebende Zelle mehr. BERRY beobachtete in seinen Experimenten mit Thio-TEPA bei HeLa-Zellen ebenfalls eine Schulter, wenngleich diese nur angedeutet vorhanden war. Ebenso fanden MAURO und ELKIND (1968) bei ihren Versuchen mit Schwefellost eine Schulter im Anfangsteil ihrer Dosiseffektkurve. Sie schlossen daraus, daß die Überlebenden anfangs nur subletal geschädigt sind. Es ist beim Vergleich der Ergebnisse von BERRY (1966) mit den hier vorgelegten zu bedenken, daß BERRY das Thio-TEPA im Dauerversuch anwendete, während in dieser Arbeit die Exposition auf 30 Minuten begrenzt war. Dies entspricht den Bedingungen in vivo besser.

In der Dosiseffektkurve wurden nur Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, berücksichtigt. Die Größe der einzelnen Kolonien, die bei verschiedenen Thio-TEPA-Konzentrationen stark schwankte, wurde in dieser Arbeit nicht erfaßt. Bei hohen Dosen war die Größe der Klone wesentlich geringer als in den entsprechenden Kontrollen.

JOHNSON u. a. (1965) beschrieben nach der Behandlung von L1210-Leukämiezellen, auf die sie Cyclophosphamid einwirken ließen, einen Anstieg in der Zellverdoppelungszeit und eine verminderte Virulenz. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen sie in Experimenten mit Amethopterin. Eine Rückkehr zum Verhalten der Kontrollpopulation geschah erst nach vier bis fünf Transplantat-Generationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde vornehmlich die Zerstörung der Reproduktionsfähigkeit der einzelnen Zellen bestimmt, da diese für die klinische Wirkung entscheidend ist. Bei einer Dosis von 60 $\mu\text{g/ml}$ überlebten nur wenige Prozent der Zellen und waren nur noch zur Bildung kleiner Kolonien fähig. Die übrigen in die Versuchsflaschen eingesäten Zellen waren morphologisch intakt vorhanden und mit Methylenblau anfärbbar, konnten aber keine Kolonien mehr bilden. In einigen Versuchen waren die nicht proliferationsfähigen Zellen nicht mehr wahrnehmbar. Die morphologisch erkennbare Zerstörung der Zellen nach Dosen von 80 $\mu\text{g/ml}$ und 160 $\mu\text{g/ml}$ war bei kurzer Einwirkdauer nur gering.

Die Rolle der Einwirkdauer

Die Überlebensrate der HeLa-Zellen veränderte sich in Versuchsanordnung 1 nach einer Exposition bis zu zwei Stunden und bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ nur wenig. Erst nach vier Stunden sank sie von ursprünglich 70% bei 30min. Einwirkdauer auf 28% ab. Die Ursache für dieses Verhalten kann nicht allein in der unterschiedlichen Sensibilität der Zellen in den verschiedenen Phasen ihres Teilungszyklus liegen, sondern bei ungestörter Progression der Zellen durch den Zyklus kann dieser

Effekt nur für eine zusätzliche Inaktivierung von 10% der Population verantwortlich gemacht werden.

Bei Versuchen mit synchronisierten HeLa-Zellen fanden FOX und NIAS (1968), daß die größte Empfindlichkeit der Zellen für das alkylierende Cytostatikum Methansulfonsäuremethylester (MMS) in der G₁-Phase bestand. Eine 30 Minuten dauernde Behandlung mit MMS an HeLa-Zellen war zweimal so wirksam wie eine 13 Minuten dauernde gleicher Konzentration.

WALKER u. THATCHER (1968) behandelten L-Zellen mit 0,6 µg Lost/ml und fanden in den ersten fünf Stunden eine normale oder nur wenig beeinträchtigte Zellvermehrung; nach zehn Stunden hatte jedoch die Vermehrung in allen behandelten Kulturen vollständig aufgehört. Sie nahmen an, daß sich entweder diejenigen Zellen, die die Mitose nach zehn Stunden nicht erreichten, nicht erfolgreich teilen würden, oder daß die Zahl der gesunden Zellen zu klein sei, um die Koloniedichte auffallend anwachsen zu lassen.

Auch wenn in unseren Versuchen ein anderer Parameter der Thio-TEPA-Wirkung gemessen wurde, ist doch die Ähnlichkeit der Abhängigkeit des Ergebnisses von der Behandlungsdauer auffallend. Die Überlebensrate in der ersten Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit zeigt ebenfalls eine nur wenig beeinträchtigte Zellvermehrung in den ersten Stunden der Thio-TEPA-Exposition. Nach vier Stunden ist die Zahl der überlebenden Zellen jedoch stark abgefallen.

In der zweiten Versuchsanordnung wirkten 80 µg Thio-TEPA/ml auf einen sehr dicht gewachsenen Zellrasen ein. Diese hohe Zelldichte und die von den Zellen abgegebene Proteinschicht haben vielleicht die inaktivierende Wirkung der in der ersten Versuchsanordnung letalen Thio-TEPA-Konzentration verzögert. Die Zahl der überlebenden Zellen verringerte sich mit zunehmender Einwirkdauer sehr stark. Nach vier Stunden

Exposition wurde in allen Versuchsreihen keine Koloniebildung gefunden. Bei diesem Versuchsansatz dürfte neben dem Zellzyklus-Effekt und anderen zeitabhängigen Effekten auch die verlangsamte Diffusion des Thio-TEPA durch die sehr dicht gewachsene Zellschicht eine Rolle für die Größe der Überlebensrate spielen.

Fraktionierungsversuch

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob in Analogie zu Röntgenstrahlen bei fraktionierter Anwendung von Thio-TEPA eine Erholung vom subletalen Schaden der Zellen eintritt.

Eine Vielzahl von tierischen Zellen zeigt nach der Behandlung mit ionisierenden Strahlen oder radiometischen, alkylierenden Mitteln eine exponentielle Überlebenskurve, die durch eine Schulter eingeleitet ist. Bei mit Röntgenstrahlen behandelten tierischen Zellen kommt es regelmäßig zur Ausbildung einer Schulter (Abb. 7).

Dieser Kurvenverlauf wird möglicherweise durch die Anhäufung sublethaler Schäden bewirkt, die für sich allein nicht zur Zelleninaktivierung führen, aber die Zellen gegenüber der cytotoxischen Wirkung einer weiteren Bestrahlung sensibilisieren. Die Zellen können sich von diesem subletalen Strahlenschaden schnell erholen, wie von ELKIND (1970) mit der Technik der fraktionierten Bestrahlung nachgewiesen wurde. Er fand bei Versuchen mit chinesischen Hamsterzellen, daß sich die Wirkung von zwei Röntgendosen, die durch ein Ruheintervall getrennt waren, nicht einfach zu der üblichen exponentiellen Form addierten, sondern eine zweite Schulter ergaben, wodurch sich die Wirkung der Gesamtdosis deutlich verminderte. Sie interpretierten dieses Ergebnis als eine Erholung von dem durch die

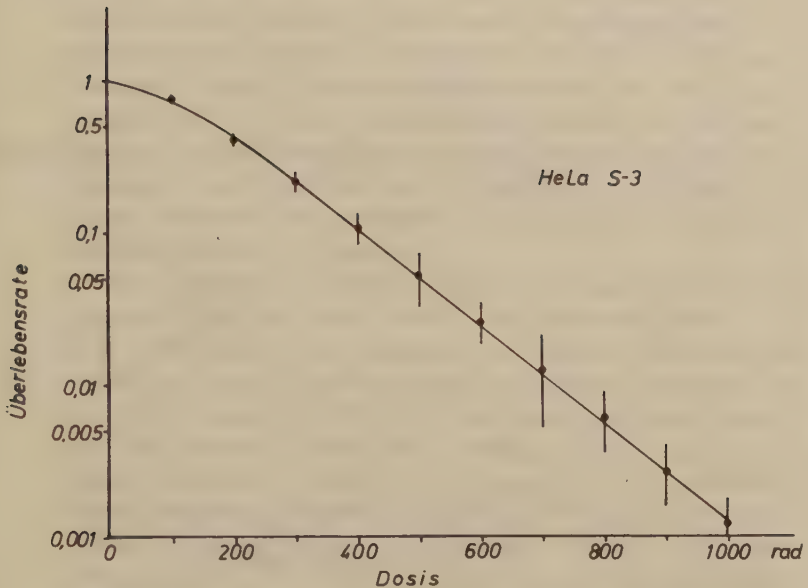


Abb. 7. Überlebensrate von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis (TROTT, unveröffentl.)

erste Dosis verursachten subletalen Schaden. Dieser Effekt läßt sich auch an HeLa-Zellen nachweisen (Abb. 8).

WALKER u. THATCHER (1968) fanden ebenso wie SAKAMOTO u. ELKIND (1969) bei Versuchen mit Stickstofflost keinen Fraktionierungseffekt, obwohl dieses Cytostatikum eine Schulter in der Dosiseffektkurve aufweist. Ähnliche Ergebnisse liegen für MMS (FOX u. NIAS, 1968) vor. Bei fraktionierter Gabe von Schwefellost kam es bei chinesischen Hamsterzellen zu einer

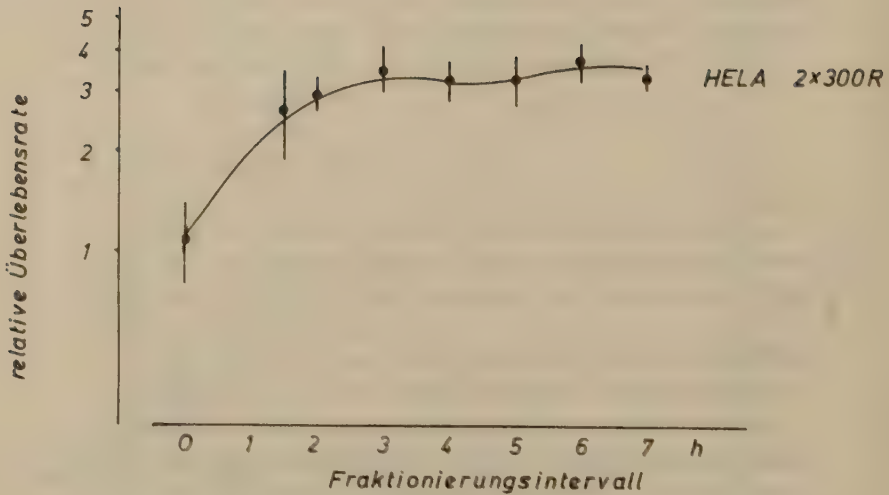


Abb. 8. Überlebensrate der HeLa-Zellen in Abhängigkeit vom Fraktionierungsintervall bei einer Strahlendosis von 2 x 300R (TROTT, unveröffentl.)

vollständigen Wiederherstellung der Schulter und damit zu einer Erhöhung der Überlebensrate (MAURO u. ELKIND, 1968), während dieser Effekt bei L-Zellen nicht auftrat (WALKER u. THATCHER, 1968). FOX u. NIAS (1970) behandelten P388F-Zellen mit MMS und verabreichten die zweite Dosis nach drei bis vierundzwanzig Tagen. Es bildeten sich kleine Kolonien, die nun empfindlicher auf Cytostatika reagierten. Die Unterbrechung der bei-

den 50 μ g MMS/ml Dosen durch eine Pause von einer Stunde ergab eine leichte Verminderung der Koloniezahl, ein längeres Intervall führte zu einem noch stärkeren Rückgang. Diese Fraktionierungsversuche von FOX u. NIAS zeigen, daß der Empfindlichkeitszuwachs innerhalb einer Stunde entsteht und progressiv mit der Zeit zunimmt. Auch HeLa-Zellen erwiesen sich als unfähig, einen durch MMS verursachten Schaden wie im Falle von Röntgenstrahlen zu beheben.

Bei der ersten Versuchsanordnung dauerten die Intervalle ein bis vier Stunden. Die Konzentration betrug 10 μ g/ml, die Einwirkdauer zweimal 30 Minuten. Durch die Fraktionierung ergab sich keine Erhöhung der Überlebensrate; die Zahl der Kolonien nahm sogar mit der Intervalldauer ab. Zu dem gleichen Ergebnis führte die zweite Versuchsanordnung, bei der ebenfalls keine Erholung stattfand. Dagegen führte eine fraktionierte Bestrahlung mit 2 x 300rad zu einer deutlichen Erholung (Abb. 8). Die Überlebensrate stieg bei Intervallen von ein bis zwei Stunden auf das Mehrfache des Wertes an, der bei nicht fraktionierter Behandlung erzielt wurde.

1. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Konzentration

Tabelle 2

Es wurden 4 Versuche durchgeführt, bei denen 10 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}^*$	Ü.R.**
99	462	310, 293, 277, 302, 284,	293	64
112	315	243, 274, 198, 215, 277,	241	68
96	345	281, 265, 253, 274,	268	80
100	304	217, 236, 221, 232,	226	74
mittlere Überlebensrate				72%

Tabelle 3

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 20 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}^*$	Ü.R.**
96	345	222, 236, 201, 283,	235	70
100	304	201, 216, 202, 185,	201	66
104	371	203, 197, 214, 189,	200	52
100	230	196, 134, 157, 148,	159	69
mittlere Überlebensrate				64%

PE (Kolonieausbeute der Kontrollen)

* $\bar{n}$ (Mittelwert der Zahl der Kolonien)

**Ü.R. (Überlebensrate in %)

den 50 μ g MMS/ml Dosen durch eine Pause von einer Stunde ergab eine leichte Verminderung der Koloniezahl, ein längeres Intervall führte zu einem noch stärkeren Rückgang. Diese Fraktionierungsversuche von FOX u. NIAS zeigen, daß der Empfindlichkeitszuwachs innerhalb einer Stunde entsteht und progressiv mit der Zeit zunimmt. Auch HeLa-Zellen erwiesen sich als unfähig, einen durch MMS verursachten Schaden wie im Falle von Röntgenstrahlen zu beheben.

Bei der ersten Versuchsanordnung dauerten die Intervalle ein bis vier Stunden. Die Konzentration betrug 10 μ g/ml, die Einwirkdauer zweimal 30 Minuten. Durch die Fraktionierung ergab sich keine Erhöhung der Überlebensrate; die Zahl der Kolonien nahm sogar mit der Intervalldauer ab. Zu dem gleichen Ergebnis führte die zweite Versuchsanordnung, bei der ebenfalls keine Erholung stattfand. Dagegen führte eine fraktionierte Bestrahlung mit 2 x 300rad zu einer deutlichen Erholung (Abb. 8). Die Überlebensrate stieg bei Intervallen von ein bis zwei Stunden auf das Mehrfache des Wertes an, der bei nicht fraktionierter Behandlung erzielt wurde.

1. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Konzentration

Tabelle 2

Es wurden 4 Versuche durchgeführt, bei denen 10 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}^*$	Ü.R.**
99	462	310, 293, 277, 302, 284,	293	64
112	315	243, 274, 198, 215, 277,	241	68
96	345	281, 265, 253, 274,	268	80
100	304	217, 236, 221, 232,	226	74
mittlere Überlebensrate				72%

Tabelle 3

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 20 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}^*$	Ü.R.**
96	345	222, 236, 201, 283,	235	70
100	304	201, 216, 202, 185,	201	66
104	371	203, 197, 214, 189,	200	52
100	230	196, 134, 157, 148,	159	69
mittlere Überlebensrate				64%

PE (Kolonieausbeute der Kontrollen)

* $\bar{n}$ (Mittelwert der Zahl der Kolonien)

**Ü.R. (Überlebensrate in %)

Tabelle 4

Es wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem 30 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	U.R.
97	202	119, 78, 106, 76, 81,	92	46%

Tabelle 5

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 40 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	U.R.
99	1542	318, 281, 296, 332,	306	20
100	304	125, 69, 78, 71,	85	28
96	345	172, 104, 110, 131,	129	38
100	460	169, 182, 109, 121,	145	31

mittlere Überlebensrate 30%

Tabelle 6

Es wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem 50 µg Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	U.R.
99	892	54, 68, 94, 83,	74	8%

Tabelle 7

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 60/ug Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	U.R.
100	1000	35, 20, 17, 26,	24	2
105	371	8, 14, 3, 9,	8	2
101	620	39, 27, 12, 25,	25	4

mittlere Überlebensrate 3%

2. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Einwirkdauer

Tabelle 8

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 10 µg Thio-TEPA/ml eine Stunde lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
96	345	226, 248, 227, 219,	230	69
96	345	210, 238, 150, 179,	194	58
100	304	254, 196, 245, 201,	224	73
104	371	299, 274, 302, 283,	289	75
mittlere Überlebensrate				69%

Tabelle 9

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 10 µg ThioTEPA/ml zwei Stunden lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
96	345	169, 247, 115, 132, 234,	179	53
92	370	210, 223, 177, 154,	191	56
100	304	202, 217, 225, 209,	213	70
104	380	218, 265, 232, 224,	234	59
mittlere Überlebensrate				60%

Tabelle 10

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 10 µg Thio-TEPA/ml vier Stunden bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
96	690	263, 185, 161, 153,	190	28
100	1250	332, 314, 345, 298, 326,	323	25
98	287	76, 92, 101, 84, 67,	84	30
mittlere Überlebensrate				28%

3. Abhängigkeit der Überlebensrate vom Fraktionierungsintervall

Tabelle 11

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 10/ug Thio-TEPA/ml zweimal 30 Minuten bei 37°C auf die Zellen einwirkten. Beide Dosen waren durch ein Zeitintervall von einer Stunde getrennt.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
112	386	209, 219, 207, 230,	216	50
100	304	212, 169, 203, 190,	193	63
97	202	142, 107, 114, 128, 93	116	59
mittlere Überlebensrate				57%

Tabelle 12

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 10/ug Thio-TEPA/ml zweimal 30 Minuten bei 37°C auf die Zellen einwirkten. Beide Dosen waren durch ein Zeitintervall von zwei Stunden getrennt.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
112	386	251, 178, 243, 228,	225	52
100	304	244, 198, 177, 193,	203	66
97	202	126, 145, 97, 135, 101,	120	61
mittlere Überlebensrate				60%

Tabelle 13

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 10 µg Thio-TEPA/ml zweimal 30 Minuten bei 37°C auf die Zellen einwirkten. Beide Dosen waren durch ein Zeitintervall von vier Stunden getrennt.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
112	386	150, 232, 178, 225,	196	45
100	304	183, 176, 167, 148,	168	55
97	202	75, 108, 82, 95, 126,	97	49
mittlere Überlebensrate				50%

Zweiter Versuchsansatz

4. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Konzentration

Tabelle 14

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 80/ug Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
53	370	115, 113, 114, 117, 121,	116	58
47	700	158, 164, 186, 149,	164	50
44	1000	230, 265, 306, 281, 326,	281	64
56	720	282, 312, 245, 234,	268	66
mittlere Überlebensrate				59%

Tabelle 15

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 160/ug Thio-TEPA/ml 30 Minuten lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
60	1500	172, 199, 157, 124, 128,	156	17
52	700	140, 140, 91, 116,	121	33
55	1400	218, 209, 196, 232,	213	27
49	1750	145, 184, 161, 197,	172	20
mittlere Überlebensrate				24%

5. Abhängigkeit der Überlebensrate von der Einwirkdauer

Tabelle 16

Es wurden vier Versuche durchgeführt, bei denen 80/ug Thio-TEPA/ml eine Stunde lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
60	3000	237, 218, 256, 224, 193,	225	12
56	1100	160, 185, 149, 194,	172	28
62	790	102, 119, 92, 131,	111	22
58	3160	360, 337, 213, 272,	295	16
mittlere Überlebensrate				20%

Tabelle 17

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 80/ug Thio-TEPA/ml zwei Stunden lang bei 37°C auf die Zellen einwirkten.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
60	2480	29, 59, 65, 41,	48	3
56	2600	21, 97, 36, 68, 84,	61	4
62	14830	107, 75, 168, 121,	117	1
mittlere Überlebensrate				3%

6. Abhängigkeit der Überlebensrate vom Fraktionierungsintervall

Tabelle 18

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 80 µg Thio-TEPA/ml zweimal 30 Minuten bei 37°C auf die Zellen einwirkten. Beide Dosen waren durch ein Zeitintervall von einer Stunde getrennt.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
65	1400	106, 137, 72, 93,	102	11
70	2970	291, 259, 256, 324, 353,	296	14
54	980	98, 132, 120, 157, 143,	130	24
mittlere Überlebensrate				17%

Tabelle 19

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 80 µg Thio-TEPA/ml zweimal 30 Minuten bei 37°C auf die Zellen einwirkten. Beide Dosen waren durch ein Zeitintervall von zwei Stunden getrennt.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
60	2040	327, 255, 303, 358, 339,	316	25
58	1620	176, 198, 143, 159, 152,	165	17
53	2900	192, 163, 248, 155,	189	12
mittlere Überlebensrate				18%

Tabelle 20

Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen 80/ug Thio-TEPA/ml zweimal 30 Minuten bei 37 °C auf die Zellen einwirkten. Beide Dosen waren durch ein Zeitintervall von vier Stunden getrennt.

P.E.	Einsaat	Zahl der Kolonien pro Flasche	$\bar{n}$	Ü.R.
51	3800	200, 154, 129, 168,	163	8
70	1560	252, 303, 142, 163, 195,	211	19
58	3920	286, 261, 356, 318,	305	13
mittlere Überlebensrate				13%

Zusammenfassung

Die Inaktivierung der HeLa-Zellen durch Thio-TEPA nimmt bei konstanter Einwirkdauer mit der Konzentration in charakteristischer Weise zu. Die Konzentrationseffektkurve von Thio-TEPA zeigt eine Analogie zu den Dosiseffektkurven bei ionisierenden Strahlen. Bei konstanter Konzentration und variabler Einwirkdauer konnte in den ersten Stunden keine wesentliche Zunahme des cytostatischen Effekts gezeigt werden. Im Gegensatz zu einer fraktionierten Bestrahlung führt die Fraktionierung der Zytostatika in der Regel und ganz besonders bei unseren Versuchen mit Thio-TEPA, nicht zu einer Verminderung der Wirkung auf Grund von Erholungsvorgängen. Für die klinische Anwendung von Thio-TEPA und anderen Zytostatika, bei denen ebenfalls unter fraktionierter Applikation keine intrazelluläre Erholung nachgewiesen werden konnte, ergibt sich folgender Schluß:

Vom rein zellulären Aspekt aus sollte die Wirkung des Zytostatikums unabhängig von der zeitlichen Dosisverteilung sein. Das Zytostatikum greift aber auch in die Proliferationskinetik der nicht inaktivierten Zellen ein und beeinflußt die homöostatischen Mechanismen der verschiedenen Gewebe. Dies kann mit Änderungen der Empfindlichkeit der Gesamtzellpopulation verbunden sein. Auf Grund dieser komplexen Zusammenhänge könnte trotz der vorgelegten Befunde von der Unabhängigkeit des cytostatischen Effektes von der Fraktionierung der onkostatistische Effekt in der klinischen Anwendung außer von der Gesamtdosis auch von der Höhe der Einzeldosis und der Länge der behandlungsfreien Intervalle abhängen.

Literatur

1. BERRY, R. J.: A comparison of effects of some chemotherapeutic agents and those of X-rays on the reproductive capacity of mammalian cells. *Nature* 203, 1150-1153 (1964 b).
2. ELKIND, M. M., Whitmore, G. F.: *The radiobiologie of cultured mammalian cells*. New York: Gordon & Breach 1967.
3. FOX, M., NIAS, A. H. W.: A modification of the sensitivity of mammalian cells surviving treatment with methyl methane sulfonate. *Europ. J. Cancer* 4, 325-335 (1968).
4. FOX, M., GILBERT, C. W., LAJTHA, L. G., NIAS, A. H. W.: The interpretation of "split-dose" experiments in mammalian cells after treatment with alkylating agents. *Chem. Biol. Interactions* 1, 241-246 (1970).
5. FOX, M., GILBERT, C. W.: The influence of recovery from sublethal damage on the response of cells to protacted irradiation at low dose-rate. *Current topics in radiation research VII*, 71-103 (1970).
6. HUG, O.: *Medizinische Strahlenkunde. Biophysikalische Einführung für Studierende und Ärzte*. Springer - Verlag (Berlin - Heidelberg - New York) 1974.
7. JOHNSON, R. E., ZELEN, M. and KEMP, N. H.: Chemotherapeutic effects on mammalian tumour cells-I. Modification of leucaemia L1210 growth kinetics and karyotype with an alkylating agent. *J. nat. Cancer Inst.* 34, 277 (1965).

8. JOHNSON, R. E., ZELEN, M. and HARDY, W. G.: Chemothe-
rapeutic effects on mammalian tumour cells-III.
Modification of L1210 growth kinetics with an anti-
metabolite. J. nat. Cancer Inst. 36, 15 (1966).
9. MAURO, F., ELKIND, M. M., SAKAMOTO, K.: Differences
in survival variations during the growth cycle of
cultured Chinese hamster cells treated with X-rays
and sulfur mustard. Cancer Res. 28, 1150-1156
(1968 a).
10. NIAS, A. H. W.: The sensivity of mammalian cells to
repeated radiotherapy and chemotherapy. Proceeding
of the second congress of the European Association
of Radiology, Amsterdam (1971).
11. SAKAMOTO, K., ELKIND, M. M.: X-rays and nitrogen mu-
stard: Independent action in Chinese hamster cells.
Biophys. J. 9, 1115-1130 (1969).
12. SINCLAIR, W. K.: Radiation survival in synchronous
and asynchronous Chinese hamster cells in vitro.
Biophysical aspects of radiation quality. 2nd pa-
nel report. Wien: IAEA 1968 b.
13. TROTT, K. R.: Strahlenwirkungen auf die Vermehrung
von Säugetierzellen. In: Handbuch der Medizinischen
Radiologie, II/3. Hrsg. O. Hug und A. Zuppinger.
Springer - Verlag (Berlin - Heidelberg - New York)
1972.
14. WALKER, I. G., THATCHER, C. J.: Studies on the lethal
effects of sulfur mustard on dividing mammalian
cells. Radiat. Res. 34, 110-127 (1968)

Lebenslauf

Ich wurde am 17. Mai 1947 als Sohn des Kaufmanns Richard Philipp und seiner Ehefrau Romana, geb. Ertl in Bischofswiesen geboren.

1953 besuchte ich die erste Klasse Volksschule in Salzburg, anschließend übersiedelte ich mit meinen Eltern nach München. 1958 trat ich in das Realgymnasium Kloster Schäftlarn ein und bestand 1968 das Abitur am Theresien-Gymnasium München.

Von 1968 bis 1972 studierte ich auf der Universität Wien Humanmedizin. Danach setzte ich mein Studium an der Ludwig Maximilians-Universität in München fort, wo ich am 31. Januar 1975 das Staatsexamen ablegte. Seit 1. Juni 1975 arbeite ich als Medizinalassistent an der I. Medizinischen Universitätsklinik München.

